



雌性中华蜜蜂胚胎发育组织形态观察

朱翔杰, 徐新建, 周姝婧, 郝振帮, 陈琳, 周冰峰*

(福建农林大学动物科学学院(蜂学院), 福州 350002)

摘要:【目的】探索雌性中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 胚胎组织发育过程。【方法】在正常蜂群中, 用蜂王产卵控制器将蜂王限制在工蜂巢房的巢脾上产卵 1 h, 蜂王在工蜂巢房中产下的卵是受精的雌性卵, 将有卵的巢脾割下放入恒温恒湿箱中培养。恒温恒湿箱中样本所在的位置温度严格控制在 $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 相对湿度 $75\% \pm 5\%$ 。把限王产卵 1 h 内获得的蜜蜂卵作为 0 h 胚胎, 每隔 4 h 取样一次。采用石蜡切片技术, 对二倍体雌性中华蜜蜂胚胎发育过程进行观察。【结果】根据胚胎发育过程中的形态特征, 雌性中华蜜蜂胚胎发育过程划分为 4 个阶段: (1) 卵裂期 (0–12 h), 活质体迁移到卵的表面, 呈双层排列; (2) 胚盘形成期 (12–28 h), 活质体排列为单层, 并形成细胞膜; (3) 胚层形成期 (28–40 h), 侧板覆盖中板, 两者在腹中线愈合; (4) 胚胎器官系统形成期 (40–68 h)。【结论】本研究明确了雌性中华蜜蜂胚胎发育过程的形态变化, 进行了阶段划分并明确了各发育阶段的形态特征及对应的发育时间。本项研究结果有助于开展与蜜蜂胚胎发育的相关蜜蜂生态学、发育生物学、营养学等课题深入研究。

关键词: 中华蜜蜂; 胚胎发育; 卵裂; 胚盘; 胚层

中图分类号: Q964 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2020)03-0285-09

Histomorphological observation of the embryonic development of female *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae)

ZHU Xiang-Jie, XU Xin-Jian, ZHOU Shu-Jing, HAO Zhen-Bang, CHEN Lin, ZHOU Bing-Feng*
(College of Animal Sciences (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: 【Aim】This study aims to explore the embryonic development process of the female Eastern hive honey bee, *Apis cerana cerana*. 【Methods】In the normally developed colony of *A. c. cerana*, the queen was restricted to the comb with worker cells for 1 h by the queen controller. The queen laid fertilized female eggs in the worker cells. Then the patch of comb with these eggs was cut off and incubated at the conditions of constant temperature $35 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and RH $75\% \pm 5\%$ in incubator. The newly obtained eggs laid by queen within 1 h were set as the age 0 h, and egg samples were collected every 4 h. The embryonic development of female *A. c. cerana* was observed by paraffin section based on female eggs. 【Results】Based on the morphological characteristics, the embryonic development process of female *A. c. cerana* can be divided into four stages: (1) Cleavage (0–12 h), with energids moving to the surface of embryo in a double-layer arrangement; (2) Formation of blastoderm (12–28 h), with energids arranged in a single layer and cytomembrane form; (3) Formation of germinal layers (28–40 h), with lateral plates covering the middle plate, and then two lateral plates coalescing together at the ventral midline; (4) Formation of organ systems (40–68 h). 【Conclusion】In this study, the

基金项目: 现代农业蜂产业技术体系建设专项资金 (CARS-45-KXJ11); 福建省自然科学基金项目 (2016J01699)

作者简介: 朱翔杰, 女, 1982 年 1 月生, 黑龙江哈尔滨市延寿县, 博士, 副教授, 研究方向为蜜蜂生态学, E-mail: xiangjie_zhu@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: bingfengz@126.com

收稿日期 Received: 2019-09-25; 接受日期 Accepted: 2019-11-30

morphological changes of embryos of female *A. c. cerana* were identified, and the developmental stages and corresponding time were defined based on the morphological characteristics of each stage. The results of this study are helpful for the further study of honey bee ecology, developmental biology, and nutritional science related to embryonic development.

Key words: *Apis cerana cerana*; embryonic development; cleavage; blastoderm; germinal layer

研究昆虫胚胎发育过程,有助于理解幼虫器官起源和发生过程,以及成虫生理和组织结构(Campos-Ortega and Hartenstein, 1986; 彩万志等, 2011)。中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 是我国宝贵的本土蜂种资源,作为重要的授粉昆虫,在维护生态系统的稳定中发挥重要作用(Burkle *et al.*, 2013; Stanley *et al.*, 2017)。蜜蜂也是发育狭温性社会昆虫的典型代表,与广温性昆虫相比,蜜蜂胚胎的发育速率稳定,是研究胚胎发育的理想素材。蜜蜂胚胎是在稳定的理想温度条件下完成发育的(Seeley and Heinrich, 1981; Kronenberg and Heller, 1982; Stabentheiner *et al.*, 2010; 苏荣茂等, 2014),蜂巢的中心最为稳定,可维持在蜜蜂胚胎最佳发育温度 35℃ (Heinrich, 1993; 周冰峰, 2002; Kleinhenz *et al.*, 2003; 周莉等, 2015)。在 35℃ 条件下,中华蜜蜂完成胚胎发育所需的时间也是非常精确的,平均为 69.8 h (江天宝, 2004; 陈琳等, 2017)。

蜜蜂胚胎发育研究起步较早,自 19 世纪后半叶以来就开展了形态学研究(Nelson, 1915; Lee, 1958; Fyg, 1959)。蜜蜂胚胎属于长胚带胚胎。1915 年 Nelson (1915) 出版了专著《The Embryology of the Honey Bee》,通过显微镜观察蜜蜂卵的石蜡切片,用手绘图全面系统地展示了西方蜜蜂 *A. mellifera* 胚胎发育过程,将蜜蜂胚胎发育划分出卵裂期、胚盘形成期、胚带和胚层形成期、器官系统形成期,并记录了各阶段的组织或器官的形成过程。Schnetter (1934) 对胚胎早期的发育进行了扩展研究。上皮细胞的运动在昆虫早期胚胎形态发生中起着重要的作用,随着电镜扫描技术的应用,Flieg 和 Sander (1986, 1988) 观察了蜜蜂胚胎表面的形态变化和细胞运动。采用冷冻切片进行碘化丙啶染色的方法,通过观察东方蜜蜂胚胎不同阶段的纵切图,观察了细胞的分布变化(Hu *et al.*, 2019a)。

蜜蜂雌雄胚胎染色体倍型不同。正常情况下,雌性胚胎是由受精后的二倍体卵发育,雄性胚胎由未受精的单倍体卵发育。蜂王将受精卵产在较小的六角形工蜂巢房和圆柱形王台中,将未受精卵产在较大的六角形雄蜂巢房中。雌性胚胎在完成发育

后,在胚后发育中由于食物和发育空间不同分化成蜂王和工蜂(周冰峰, 2002)。雄性胚胎在胚后发育中成为雄蜂。蜜蜂雌雄胚胎在发育期有所不同,雄性蜜蜂胚胎发育期略长。

蜜蜂胚胎发育规律是研究蜜蜂生物学的基础和养蜂技术研发的理论基础。前人对蜜蜂胚胎的研究多集中在西方蜜蜂。由于蜜蜂胚胎非常脆弱,特别是胚胎早期,石蜡切片技术容易导致胚胎变形破裂(胡小芬等, 2016),因此文献中很少见到蜜蜂胚胎的切片照片,大部分是手绘图。中华蜜蜂胚胎发育过程中细胞的形态、结构以及组织器官的发育过程仍需探索。本研究对中华蜜蜂胚胎发育过程形态变化开展连续观察,有助于对蜜蜂胚胎发育的机理以及胚胎发育相关的蜜蜂生态学、发育生物学、营养学等课题开展深入研究。

1 材料与方法

1.1 样本准备

中华蜜蜂 *A. c. cerana* 蜂群来自福建省福州市(119.23°E, 26.10°N)。在正常蜂群工蜂巢房中采集蜜蜂雌性卵的样本。蜂群中蜜蜂雌性卵分布在工蜂巢房和王台中,分别发育成工蜂和蜂王。工蜂巢房中的卵数量多,较容易获取。用蜂王产卵控制器将蜂王限制在有空的工蜂巢房的巢脾上产卵 1 h,获取受精的雌性蜜蜂卵。将工蜂巢房中有雌性卵的巢脾割下,放入恒温恒湿箱中(CTHI-250 型,施都凯仪器设备上海有限公司)培育。恒温恒湿箱的温湿度使用电子温湿度计每小时自动记录,样本卵发育的位置严格控制在 35 ± 0.2℃、相对湿度 75% ± 5%。把限王产卵 1 h 获得的蜜蜂卵作为 0 h 最初始的胚胎,此时的胚胎只有一个卵核,没有开始发育。此后每隔 4 h 取样一次,共选取 18 个时间点的蜜蜂胚胎进行石蜡切片和形态观察。

1.2 切片和观察

将蜜蜂卵用 5% 福尔马林和 2% 冰醋酸的 Bouin 固定液固定并保存(陈佛痴, 1980; 路健和王伶, 2001; 杨捷频, 2006)。经清洗、脱水、透明、透蜡、

切片(切片厚度为 3 μm , YD-202 型切片机, 浙江省金华市益迪医疗设备厂)、烤片、HE 染色(张玉英, 2007; 侯春春和徐水, 2009; 毛晓霞, 2013)。

胚胎切片用 B203 型生物显微镜和 TSView7 图像采集器(重庆奥特光学仪器有限公司)拍照, 在显微镜下和电脑显示器上观察。

2 结果

2.1 胚胎卵裂期

雌性中华蜜蜂胚胎卵裂期为 0 – 12 h, 该阶段存在 3 个明显的形态变化:(1) 卵核在初始位置开始核裂;(2) 核裂产生的卵裂核向卵表层移动, 同时仍在核裂;(3) 卵裂核到达卵表层继续核裂。

刚产下的蜜蜂胚胎卵核位于靠近卵孔一侧约 1/4 处(图 1: A)。卵裂开始后, 卵裂核会与一部分原生质构成星芒状(stellate-shaped)的活质体(energid), 活质体继续不断分裂(图 1: B, C)。当卵发育 4 h, 观察到整个胚胎已形成 16 个活质体, 说明此时卵核已经分裂 4 次。此时活质体位于卵核初始位置周围(图 1: B)。发育 8 h, 活质体已移动到胚胎表面, 数量也有所增加。因此 4 – 8 h, 活质体逐渐向卵的表层移动, 根据活质体数量仍在增多, 判断活质体仍在不断分裂。到达胚胎表面的原生质在靠近卵黄一侧仍呈星芒状(图 1: D)。胚胎表面的活质体继续分裂, 到 12 h 整个胚胎的表面呈现双层排列的活质体层, 星芒状突起全部消失, 呈球形(图 1: E), 卵裂期结束。

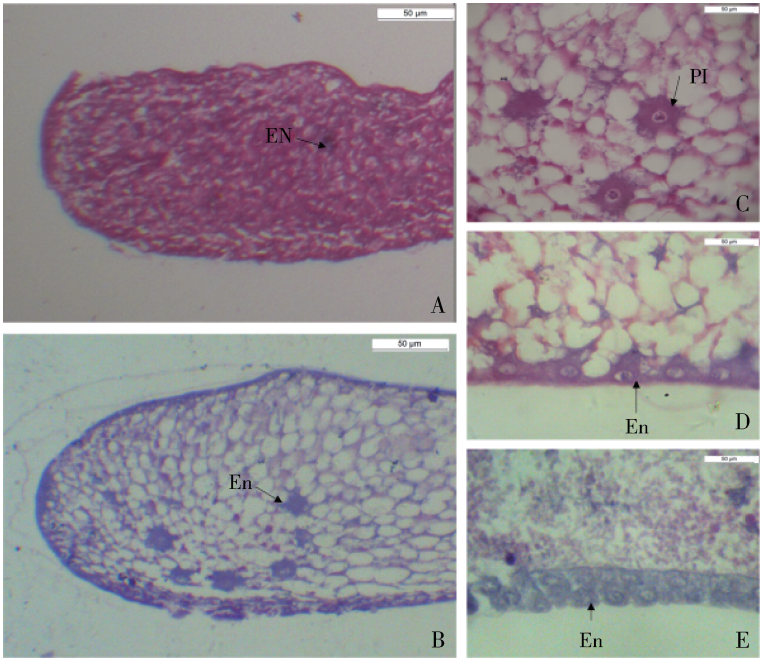


图 1 雌性中华蜜蜂胚胎卵裂期切片图

Fig. 1 Micrographs of embryos of female *Apis cerana cerana* at the cleavage stage
A: 0 h 胚胎纵切图, 箭头显示卵核 Sagittal section of the embryo at 0 h, the arrow indicating the egg nuclei; B: 4 h 胚胎纵切图, 箭头显示活质体 Sagittal section of the embryo at 4 h, the arrow indicating the energids; C: 星芒状活质体 Stellate-shaped energids; D: 8 h 胚胎纵切图, 活质体已移动到胚胎表面 Sagittal section of the embryo at 8 h, the energids having moved to the surface of the embryo; E: 12 h 胚胎纵切图, 可见双层排列不规则的活质体层 Sagittal section of the embryo at 12 h, the energid appearing in an irregular double-layer arrangement. EN: 卵核 Egg nuclei; En: 活质体 Energid; PI: 原生质 Plasma.

2.2 胚胎胚盘形成期

雌性中华蜜蜂胚盘形成期为 12 – 28 h。此阶段存在 2 个形态上的变化:(1) 双层活质体层变成单层;(2) 活质体外面出现细胞膜, 形成细胞。

胚胎 12 h, 表面的活质体层为双层(图 1: E), 胚胎 16 h 表面活质体由双层向单层变化, 内层活质体向外移动, 内层活质体数量明显变少(图 2: A), 在 20 h 变为单层(图 2: B)。发育至 24 h, 活质体拉

长, 原生质分为两个部分: 靠近卵表面包围卵核的一部分原生质; 靠近卵内部的剩余一部分原生质。靠近卵表面包围卵核的一部分原生质相互分离(图 2: C), 靠近卵内部的原生质将融合, 最终消失。发育至 28 h, 细胞膜完全包围卵核周围的原生质, 成为完整的细胞。整个胚胎表面形成单层细胞结构, 即胚盘(图 2: D)。

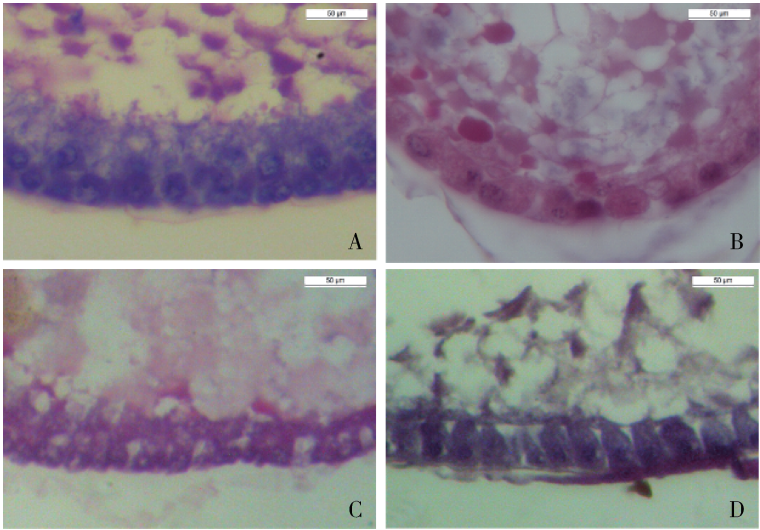


图2 雌性中华蜜蜂胚胎胚盘形成期切片图

Fig. 2 Micrographs of the parafin section of embryos of female *Apis cerana cerana* at the blastoderm formation stage
A: 16 h 胚胎, 胚胎表面活质体由双层向单层的变化中 Embryo at 16 h, the energid in the embryonic inner layer moving to the outer layer; B: 20 h 胚胎, 活质体呈现单层结构 Embryo at 20 h, the energid appearing in a single layer arrangement; C: 24 h 胚胎, 活质体拉长, 使原生质分为两个部分: 靠近卵表面包围卵核的原生质和靠近卵内部的原生质 Embryo at 24 h, the energid being elongated to make the plasma divided into two parts: the protoplast surrounding the egg nucleus and near the egg interior; D: 28 h 胚胎, 胚胎表面形成单层细胞层, 胚胎内部充斥卵黄 Embryo at 28 h, the monolayer cells formed on the surface of embryo, and the interior of embryo being full of yolk.

2.3 胚层形成期

雌性中华蜜蜂胚层形成的时间在 32 – 40 h。此阶段存在 3 个形态变化: (1) 胚胎两个侧面的细胞

向腹面移动, 愈合形成外胚层; (2) 胚胎腹面细胞被两侧面细胞包裹, 形成中胚层; (3) 胚胎背面的胚盘细胞变薄且范围变大 (图 3)。

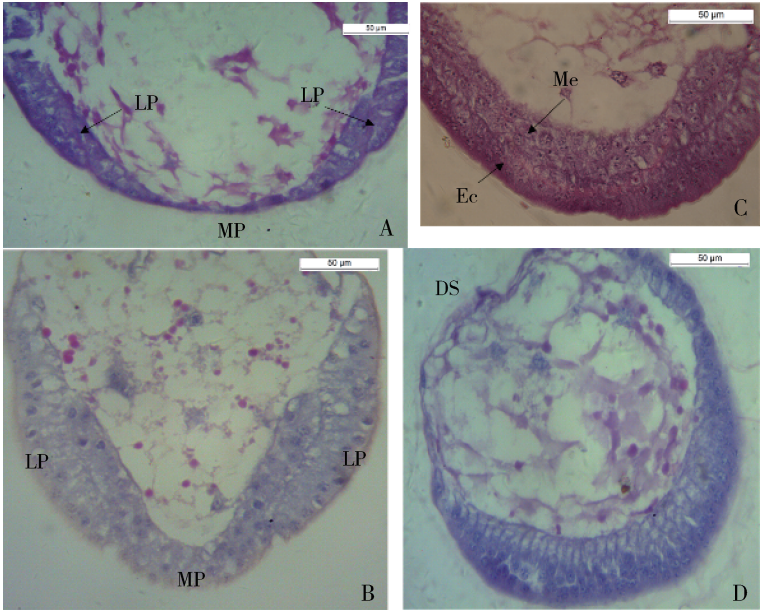


图3 雌性中华蜜蜂胚胎胚层形成过程切片图

Fig. 3 Micrographs of the parafin section of embryos of female *Apis cerana cerana* at the germinal layer stage
A: 32 h 胚胎横切图, 腹中线两侧各出现一条沟痕, 将胚盘分为中板和两个侧板 Transverse section of the embryo at 32 h, a groove mark appearing on both sides of the ventral midline, and the blastoderm being divided into the middle plate and two lateral plates; B: 36 h 胚胎横切图, 侧板沿中板外侧向腹中线移动 Transverse section of the embryo at 36 h, lateral plates moving to the ventral midline going along with the outer layer of the middle plate; C: 40 h 胚胎中部横切图, 侧板覆盖中板在腹中线愈合 Transverse section in the middle of the embryo at 40 h, lateral plates covering the middle plate, and then coalescing into the ventral midline; D: 32 h 胚胎头部横切图 Transverse section through the head of the embryo at 32 h. DS: 背带 Dorsal strip (of blastoderm); Ec: 外胚层 Ectoderm; LP: 侧板 Lateral plate; Me: 中胚层 Mesoderm; MP: 中板 Middle plate.

在 32 h,位于靠近卵孔一侧约 1/4 处,卵核初始位置附近的细胞最先开始分化,在腹中线两侧各形成一条沟痕,将胚盘分成中板和两个侧板(图 3: A)。随后两个侧板会沿着中板外侧向腹中线延伸(图 3: B)。在 40 h,中板被两个侧板包进胚胎内部,形成中胚层;两个侧板愈合,形成外胚层(图 3: C)。胚层完全形成,中胚层大约有胚胎的 2/3 长度,位于胚胎的中部腹面,并由外胚层包裹;在胚胎的头部和尾部,腹面仅有一层较厚的外胚层细胞(图 3: D)。

2.4 器官和系统形成期

雌性中华蜜蜂胚胎器官和系统形成的时间在 40 h 以后。器官和系统出现的先后顺序为消化系统、马氏管、丝腺和丝腺管、神经系统和呼吸系统。

2.4.1 消化系统形成:蜜蜂胚胎发育到 44 h,头部出现口道内陷(图 4: A),到 52 h 口道形成(图 4: B);在 52 h 尾部出现肛道内陷(图 4: C),到 56 h 肛道形成(图 4: D)。在 52 h 口道的末端已经出现部分中肠;在 56 h 肛道的末端也出现部分中肠,在胚胎两端形成的中肠先后向胚胎中部发育;在 60 h 中肠形成。中肠与前肠相连的位置有贛门瓣相隔(图 5)。

2.4.2 马氏管形成:胚胎发育至 48 h,尾部的细胞团背侧出现内陷形成马氏管(图 6: A),马氏管迅速的向头部生长,到 56 h 已经延伸到胚胎的中部(图 6: B),延伸到胚胎第 5 个神经节后停止向头部延伸,继续生长变得弯曲折叠。马氏管根部与中肠和后肠连接处相连(图 6: C)。中华蜜蜂胚胎的马氏管共有 4 根。

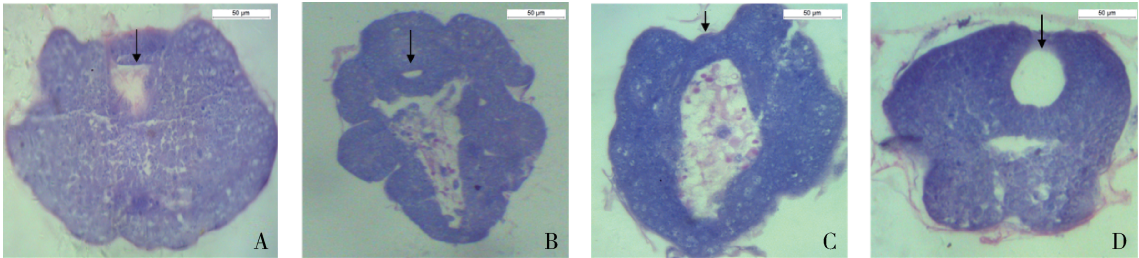


图 4 雌性中华蜜蜂胚胎口道和肛道形成过程

Fig. 4 Formation of embryonic oral and anal canals in female *Apis cerana cerana*

A: 44 h 胚胎头部表面 The head surface of the embryo at 44 h; B: 52 h 胚胎头部 The head of the embryo at 52 h; C: 52 h 胚胎尾部 The posterior end of the embryo at 52 h; D: 56 h 胚胎尾部 The posterior end of the embryo at 56 h.

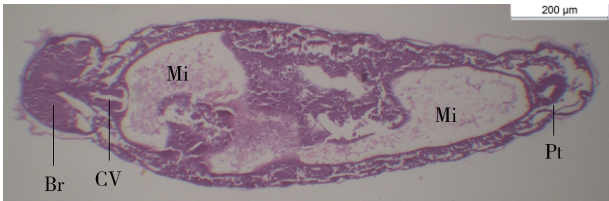


图 5 雌性中华蜜蜂 68 h 胚胎纵切图

Fig. 5 Sagittal section of embryo of female

Apis cerana cerana at 68 h

Br: 脑 Brain; CV: 贛门瓣 Cardiac valve; Mi: 中肠 Midgut; Pt: 肛道 Proctodaeum.

2.4.3 丝腺和丝腺管形成:蜜蜂胚胎的丝腺在 48 – 60 h 之间形成,两根,位于中肠下部、腹神经索两侧(图 7: A),呈管状(图 7: B);在 60 – 64 h,头部神经节下两根丝腺向腹中线汇合,闭合形成丝腺管(图 7: C)。丝腺管会向头前端延伸,在胚胎的下唇后部结束。

2.4.4 神经系统形成:蜜蜂胚胎的神经系统包括脑和腹神经索。脑分为左脑和右脑,位于胚胎头部左

右对称。在 52 h 蜜蜂胚胎头部两侧脑的位置已经形成了细胞团(图 4: B),在 64 h 蜜蜂胚胎的脑形成(图 7: C)。在 60 h 时神经节形成。蜜蜂胚胎的腹神经索共有 14 个神经节,其中 12 个位于胚胎中肠腹面,另外 2 个分别位于头部和后肠腹面(图 8: A)。与其他神经节相比,蜜蜂胚胎头部的神经节非常大,沿着食管两侧伸向背面与蜜蜂左右脑相连(图 7: C)。单个的神经节由两团呈现梭形的神经细胞群构成,这两团细胞在神经节的中部相连,使得神经节形如“H”(图 8: B, C, D)。

2.4.5 呼吸系统形成:呼吸系统由躯体左右两侧两根主气管、前气管环、后气管环、气门、气门与主气管相连的支气管以及通过腹神经节腹侧连接左右两根主气管的 10 根腹侧支气管组成。在 56 h 已经出现气管内陷,并且气管的内陷向腹侧形成支气管(图 9: A),两个气门之间的主气管形成一部分,还未相连;在 60 h 腹侧支气管形成;在 64 h 气管内陷的开口缩小形成气门(图 9: B),前后气管环形成,气管

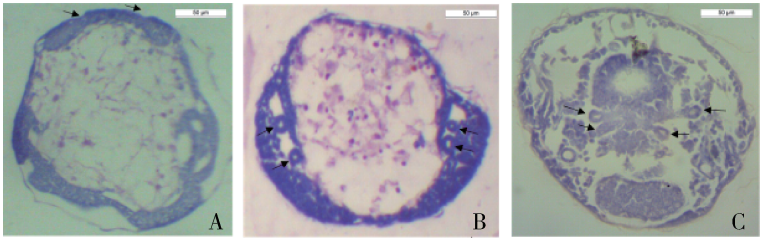


图 6 雌性中华蜜蜂胚胎马氏管的形成

Fig. 6 Formation of the Malpighian tubules of female *Apis cerana cerana* during embryogenesis

A: 48 h 胚胎尾部, 箭头所指马氏管发育初期的内陷 The end part of embryo at 48 h, the arrows indicating the imaginations at the initial development stage of the Malpighian tubules; B: 56 h 胚胎中部, 箭头指马氏管 The middle part of embryo at 56 h, the arrows indicating the Malpighian tubules; C: 68 h 胚胎中肠末端, 箭头指马氏管 The distal mid-intestine of embryo at 68 h, the arrows indicating the Malpighian tubules.

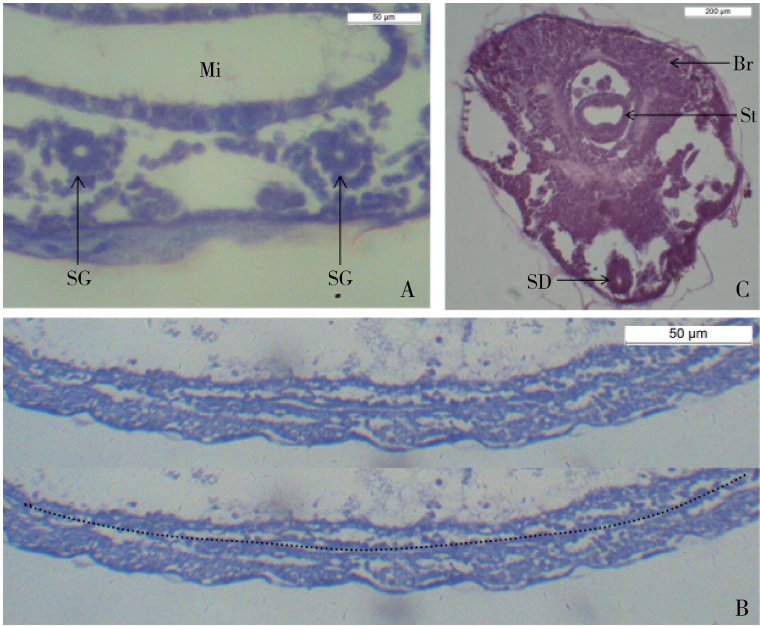


图 7 雌性中华蜜蜂胚胎丝腺和丝腺管的形成

Fig. 7 Formation of the silk gland and common duct of silk glands of female *Apis cerana cerana* during embryogenesis

A: 68 h 胚胎中部横切图 Transverse section of the middle part of embryo at 68 h; B: 60 h 胚胎纵切图 Sagittal section of the embryo at 60 h; C: 64 h 胚胎头部横切图 Transverse section through the head of embryo at 64 h. Br: 脑 Brain; Mi: 中肠 Midgut; SD: 丝腺管 Common duct of silk glands; SG: 丝腺 Silk gland; St: 口道 Stomadeum.

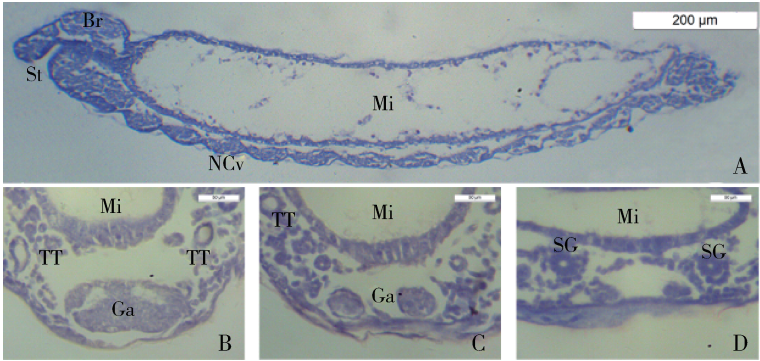


图 8 雌性中华蜜蜂胚胎神经系统的形成

Fig. 8 Formation of the nervous system of female *Apis cerana cerana* during embryogenesis

A: 60 h 胚胎纵切图 Sagittal section of the embryo at 60 h; B: 神经节中部横切图 Transverse section of a ganglion central part; C: 神经节 3/4 处横切图 Transverse section of three-fourths of the ganglion; D: 神经节之间横切图 Transverse section between ganglions. Br: 脑 Brain; Ga: 神经节 Ganglion; Mi: 中肠 Midgut; NCv: 腹神经索 Ventral nerve cord; SG: 丝腺 Silk gland; St: 口道 Stomadeum; TT: 主气管 Tracheal trunk.

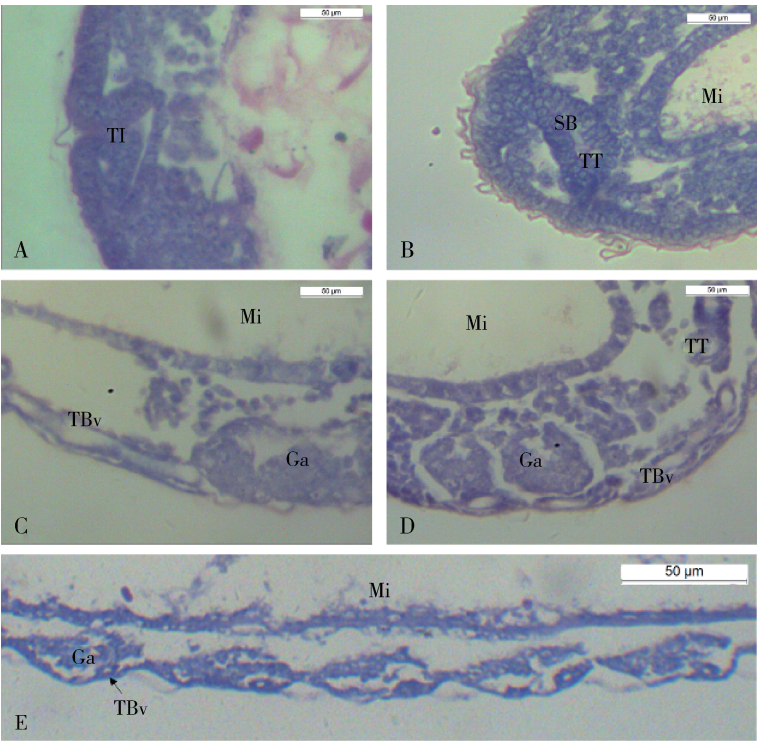


图9 雌性中华蜜蜂胚胎呼吸系统的形成

Fig. 9 Formation of the respiratory system of female *Apis cerana cerana* during embryogenesis

A: 56 h 胚胎横切图 Transverse section of the embryo at 56 h; B: 64 h 胚胎横切图 Transverse section of the embryo at 64 h; C: 60 h 胚胎横切图 Transverse section of the embryo at 60 h; D: 68 h 胚胎横切图 Transverse section of the embryo at 68 h; E: 60 h 胚胎纵切图 Sagittal sections of the embryo at 60 h. Ga: 神经节 Ganglion; Mi: 中肠 Midgut; SB: 气门分支 Spiracle branch; TBv: 腹侧支气管 Ventral tracheal branch; TI: 气管内陷 Tracheal invagination; TT: 主气管 Tracheal trunk.

系统形成。

中华蜜蜂的腹侧支气管通过神经节的腹面与两根主气管相连(图9: C, D, E),前气管环位于脑和背血管开口之间并与两根主气管相连,后气管环位于后肠腹面,并与两根主气管相连。

2.4.6 背血管形成:中华蜜蜂胚胎的背血管形成较晚,在60 h 胚胎两侧的成心肌细胞还未在背中line汇合。在64 h 可以观察到背血管形成(图10)。背血管的内径大于马氏管和气管,开口位于头胸相连的位置,前气管环后部。结束于胚胎最后一个体节和前一体节相连接的位置。在胚胎的尾部,背血管的内径随着体节的变小而变小。



图10 雌性中华蜜蜂64 h 胚胎横切图

Fig. 10 Transverse section of female *Apis cerana cerana* embryo at 64 h

DV: 背血管 Dorsal vessel; Mi: 中肠 Midgut.

3 讨论

胚胎学是研究发育、行为、进化的基础(Twyman, 2006)。本研究通过石蜡切片技术的摸索,成功获得了我国特有蜂种中华蜜蜂胚胎的切片图。根据中华蜜蜂胚胎发育特征与时间的关系,参考其他全变态昆虫(Gaunt and Miles, 2002; 原建强

等, 2008; Yue and Hua, 2010) 和前人对西方蜜蜂的研究(Nelson, 1915; Fleig and Sander, 1985, 1986),提出了中华蜜蜂胚胎发育的阶段划分,各阶段的特征以及对应的具体时间。蜜蜂作为研究胚胎发育的特色之一,体现在发育速率的稳定性,因此,明确每个发育阶段的准确时间成为可能,这是蜜蜂胚胎发育研究的特色内容。研究结果有助于更好地

理解、认识和掌握蜜蜂胚胎发育的整个过程。

卵裂阶段应以卵裂开始为起点和卵裂结束为该阶段的终点,中华蜜蜂卵裂阶段在 12 h 结束,卵裂速度快于西方蜜蜂。有研究西方蜜蜂胚胎产下 2 h 为合子形成期(Hu *et al.*, 2019b)。文献记载东方蜜蜂胚胎卵裂时间略有不同,Hu 等(2019a)观察在 4 h 时还几乎没有卵裂。本研究发现刚产下的蜜蜂二倍体胚胎卵核未发生卵裂,但发育至 4 h 根据卵裂核数量为 16 个判断卵裂已发生了 4 次。由此推测东方蜜蜂卵裂在卵产下后受精形成合子后开始,也就是卵产下 2–4 h。随后这些卵裂核向卵的表面移动,根据本研究中中华蜜蜂卵裂核在 6 h 到达卵表面,在发育 12 h 时,活质体数量不再明显增加,呈现双层排列的活质体层,因此认为中华蜜蜂在此时卵裂结束。西方蜜蜂卵裂核到达卵表面的时间 Nelson (1915)认为是在 8–10 h,而 Fleig 和 Sander (1985)用扫描电镜研究认为是 7 h,完成卵裂则需要 14~16 h(Nelson, 1915),两者在卵裂核到达卵表面的时间存在差异可能是样本精度不同产生的,更精确的时间未知,但均长于中华蜜蜂,说明中华蜜蜂卵裂速度更快。

胚盘形成的特征为卵表面单层细胞结构的形成,有研究表明中华蜜蜂在胚胎发育至 28 h 时该单层细胞结构形成,因此,中华蜜蜂胚盘形成期应为 12–28 h,历时 16 h。西方蜜蜂胚盘形成期历时 14–16 h(Nelson, 1915),也有人研究在 29 h 细胞膜还未形成,提出在 33 h 胚盘完全形成(Fleig and Sander, 1986),但通过文献中图片观察,此时靠近头部的胚层已经形成明显的凹陷,表明胚层已经分化,因此判断西方蜜蜂胚盘形成应在 29–33 h 之间完成,慢于东方蜜蜂。

蜜蜂中胚层与外胚层形成过程与许多昆虫有差异。大多数昆虫胚层形成过程中,中板细胞内陷形成一条小管,然后小管分层变为单层的中胚层,如果蝇和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*(崔峰等, 2004)。蜜蜂胚层形成过程中,没观察到小管的结构,中板向胚胎内部移动过程中,中板与侧板完全分离,侧板沿着中板表面相向延伸覆盖中板形成外胚层(图 3: A, B, C)。

器官系统形成期为 40 h 直至孵化,是蜜蜂内部器官的形成阶段。前人将该阶段以卵表面形态变化为依据细分出胚带形成期和幼虫躯体形成期 2 个阶段(Fleig and Sander, 1986)。在对中华蜜蜂胚胎切片的观察发现,即使卵表面观察到蜜蜂胚胎在背合,

而此时背血管仍未形成,在 64 h 可以观察到完整的背血管(图 10)。马氏管、中肠、后肠和气孔等器官在 64 h 后仍然在发育精致化。因此,我们认为 40 h 至胚胎发育完成的过程不宜分割,该阶段为蜜蜂器官系统形成的一个完整过程。

致谢 福建农林大学蜂学院张翠平、叶善斌、安木曼、陆启皇、付凡、邬童童、杨冉等参与部分实验,在此表示感谢!

参考文献 (References)

- Burkle LA, Marlin JC, Knight TM, 2013. Plant-pollinator interactions over 120 years: loss of species, co-occurrence, and function. *Science*, 339(6127): 1611–1615.
- Cai WZ, Pang XF, Hua BZ, 2011. General Entomology. 2nd ed. China Agricultural University Press, Beijing. 215–221. [彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 2011. 普通昆虫学. 第 2 版. 北京: 中国农业大学出版社. 215–221]
- Campos-Ortega JA, Hartenstein V, 1986. The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Quart. Rev. Biol.*, 349(4): 633–645.
- Chen FC, 1980. The Practice of Histological Techniques. Norman Bethune University of Medical Science Press, Changchun. 1–17. [陈佛痴, 1980. 组织学实验技术. 长春: 白求恩医科大学出版社. 1–17]
- Chen L, Xu XJ, Zhu XJ, Zhou SJ, Wang Q, Hao ZB, Zhou BF, 2017. Effects of low temperature stress on hatching rate and developmental duration of fertilized eggs of Italian honeybees (*Apis mellifera ligustica*). *J. Environ. Entomol.*, 39(1): 111–117. [陈琳, 徐新建, 朱翔杰, 周姝婧, 王青, 郝振帮, 周冰峰, 2017. 低温胁迫对意大利蜜蜂受精卵的孵化率和发育历期的影响. 环境昆虫学报, 39(1): 111–117]
- Cui F, Xu HF, Song HM, Wang HS, Xu YY, 2004. Studies on the embryonic development of *Spodoptera exigua* (Hübner) (I) – Cleavage, formation of blastoderm and germ band, and differentiation of germinal layers. *J. Shandong Agric. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 35(2): 213–216. [崔峰, 徐洪富, 宋红梅, 王玟晨, 许永玉, 2004. 甜菜夜蛾胚胎发育的研究 (I)——卵裂、胚盘、胚带的形成及胚层分化. 山东农业大学学报(自然科学版), 35(2): 213–216]
- Fleig R, Sander K, 1985. Blastoderm development in honey bee embryogenesis as seen in the scanning electron microscope. *Invertebr. Reprod. Dev.*, 8(4–5): 279–286.
- Fleig R, Sander K, 1986. Embryogenesis of the honeybee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): a SEM study. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, 15(5–6): 449–462.
- Fleig R, Sander K, 1988. Honeybee morphogenesis: embryonic cell movements that shape the larval body. *Development*, 103: 525–534.
- Fyg W, 1959. Normal and abnormal development in the honeybee. *Bee World*, 40(4): 85–96.

Gaunt MW, Miles MA, 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol. Biol. Evol.*, 19(5): 748–761.

Heinrich B, 1993. Heat managers. Book Reviews: The Hot-Blooded Insects. Strategies and Mechanisms of Thermoregulation. *Science*, 260(5111): 1155–1156.

Hou CC, Xu S, 2009. Analysis on the key influence factors of paraffin section's quality. *Chin. Agric Sci. Bull.*, 25(23): 94–98. [侯春春, 徐水, 2009. 浅析影响石蜡切片质量的关键因素. 中国农学通报, 25(23): 94–98]

Hu XF, Ke L, Zeng ZJ, 2016. Comparison of three methods for honeybee egg histological section. *Acta Agric. Univ. Jiangxi*, 38(4): 729–733. [胡小芬, 柯俐, 曾志将, 2016. 蜜蜂卵3种组织切片制作方法比较. 江西农业大学学报, 38(4): 729–733]

Hu XF, Ke L, Zeng ZJ, 2019a. Histomorphological study on embryogenesis of the honeybee *Apis cerana*. *J. Asia-Pacific Entomol.*, 22(3): 860–867.

Hu XF, Zhang B, Liao CH, Zeng ZJ, 2019b. High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated gene editing in honeybee (*Apis mellifera*) embryos. *G3-Genes Genomes Genetics*, 9(5): 1759–1766.

Jiang TB, 2004. Studies on Effect of Temperature on Development of Honeybee Eggs. MSc Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. 19. [江天宝, 2004. 温度对蜜蜂卵发育影响的研究. 福州: 福建农林大学硕士学位论文. 19]

Kleinhenz M, Bujok B, Fuchs S, Tautz J, 2003. Hot bees in empty broodnest cells: heating from within. *J. Exp. Biol.*, 206(23): 4217–4231.

Kronenberg F, Heller HC, 1982. Colonial thermoregulation in honey bees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Physiol. A*, 148(1): 65–76.

Lee WR, 1958. The dosage response curve for radiation induced dominant lethal mutations in the honeybee. *Genetics*, 43(3): 480–492.

Lu J, Wang L, 2001. Troubles in the manufacture of paraffin sections and its solutions. *Basic Med. Edu.*, 3(3): 263. [路健, 王伶, 2001. 石蜡切片制作中的问题与解决. 基础医学教育, 3(3): 263]

Mao XX, 2013. The improved methods of paraffin sections production. *Anhui Agric. Sci. Bull.*, 19(8): 15–16. [毛晓霞, 2013. 石蜡切片制作方法的改良. 安徽农学通报, 19(8): 15–16]

Nelson JA, 1915. The Embryology of the Honey Bee. Princeton University Press, Princeton. 282 pp.

Schnetter M, 1934. Physiologische untersuchungen uber das differenzierungszentrum in der embryonalentwicklung der honigbiene. *Dev. Genes Evol.*, 131(3): 285–323.

Seeley T, Heinrich B, 1981. Regulation of temperature in the nests of social insects. In: Heinrich B ed. Insect Thermoregulation. John Wiley & Sons Inc., New York. 160–234.

Stabentheiner A, Kovac H, Brodschneider R, 2010. Honeybee colony thermoregulation-regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PLoS ONE*, 5(1): e8967.

Stanley J, Sah K, Subbanna AR, Preetha G, Gupta J, 2017. How efficient is *Apis cerana* (Hymenoptera: Apidae) in pollinating cabbage, *Brassica oleracea* var. *capitata*? Pollination behavior, pollinator effectiveness, pollinator requirement, and impact of pollination. *J. Econ. Entomol.*, 110(3): 826–834.

Su RM, Zhou L, Sun YY, Wen XZ, Zhou BF, 2014. Study on the distribution of nest temperature of *Apis cerana cerana* in Fuzhou in spring. *Apic. China*, 65(9): 39–42. [苏荣茂, 周莉, 孙瑜扬, 温雄昭, 周冰峰, 2014. 福州中华蜜蜂春季巢温分布规律的研究. 中国蜂业, 65(9): 39–42]

Twyman RM (Translated by Wang YD, Zeng SJ, Liu N, Chen X), 2006. Developmental Biology (Chinese Version). Science Press, Beijing. 183–187. [Twyman RM (王英典, 曾少举, 刘宁, 陈星译), 2006. 发育生物学(中译版). 北京: 科学出版社. 183–187]

Yang JP, 2006. Improvement of conventional paraffin sectioning method. *J. Biol.*, 23(1): 45–46. [杨捷频, 2006. 常规石蜡切片方法的改良. 生物学杂志, 23(1): 45–46]

Yuan JQ, Bai SF, Li X, 2008. Embryonic development of *Cotesia vestalis* (Haliday) and *Diadegma semiclausum* Hellen. *J. Henan Agric. Univ.*, 42(6): 638–642. [原建强, 白素芬, 李欣, 2008. 菜蛾盘绒茧蜂和半闭弯尾姬蜂的胚胎发育. 河南农业大学学报, 42(6): 638–642]

Yue C, Hua B, 2010. Are abdominal prolegs serially homologous with the thoracic legs in Panorpidae (Insecta: Mecoptera)? Embryological evidence. *J. Morphol.*, 271(11): 1366–1373.

Zhang YY, 2007. Problems and improving measures of the paraffin section technique. *China Sci. Technol. Inform.*, (6): 91–92. [张玉英, 2007. 制作石蜡切片易出现的问题及改进措施. 中国科技信息, (6): 91–92]

Zhou BF, 2002. Bee Feeding and Management. Xiamen University Press, Xiamen, Fujian. 10–19, 147–148. [周冰峰, 2002. 蜜蜂饲养管理学. 福建厦门: 厦门大学出版社. 10–19, 147–148]

Zhou L, Zhu XJ, Xu XJ, Zhou SJ, Fu ZM, Wen XZ, Zhou BF, 2015. Nest temperature distribution and dynamics of *Apis cerana cerana* during spring thriving stage at ambient temperature 20℃. *J. Fujian Agric. For. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 44(2): 198–202. [周莉, 朱翔杰, 徐新建, 周姝婧, 付中民, 温雄昭, 周冰峰, 2015. 中华蜜蜂增长阶段气温20℃条件下巢温昼夜变化. 福建农林大学学报(自然科学版), 44(2): 198–202]

(责任编辑: 赵利辉)